J. Fd Hyg. Safety
Vol. 25, No. 3, pp. 258~262 (2010)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

대장암 세포의 방사선저항성에 대한 p53의존성 PI3K의 역할

이희관[1] · 김종석[2] · 권형철[3]*

[1]예수병원 방사선 종양학과, [2]전북대학교 의학전문대학원 생화학 교실,
[3]전북대학교병원 방사선 종양학과 및 임상의학연구소

Role of p53-dependent PI3K in Radioresistance of Colon Cancer Cells

Heui Kwan Lee[1], Jong Suk Kim[2], and Hyoung Cheol Kwon[3]*

[1]Department of Radiation Oncology, Presbyterian Medical Center, Jeonju Korea
[2]Department of Biochemistry, Chonbuk National University Medical School, Jeonju Korea
[3]Department of Radiation Oncology & Research Institute of Clinical Medicine, Chonbuk National University Hospital, Jeonju, 561-712, Korea

(Received March 9, 2010/Revised May 23, 2010/Accepted September 9, 2010)

ABSTRACT - Radiotherapy is one of the major therapies for cancer treatment. p53 acts as a central mediator of the cellular response to stressful stimuli, such as radiation. Recently it has been known that activation of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) pathway is associated with radioresistance. In this study, we investigated whether X-irradiation up-regulates PI3K in a p53-dependent manner in human colon cancer cells. In order to study this phenomenon, we have treated p53-wild type and p53-mutant type HCT116 cells with X-ray. Treatment of wild type HCT116 cells with 8 Gy resulted in a marked increase in PI3K (p85), which paralleled an increase in PTEN, a counterpart of PI3K. However, these effects of X-rays in the p53-mutant cells were not observed. These results suggest that the X-irradiation-induced up-regulation of PI3K/PTEN pathway is p53-dependent.

Key words: X-irradiation, p53, PI3K, PTEN, Colon cancer

많은 악성종양에서 전리방사선(Ionizing radiation)이 중요한 치료방법으로 이용되고 있다. 이러한 방사선치료가 세포의 죽음을 유도하기도 하지만, 세포의 생존분획의 증식을 자극하기도 한다는 점이 알려졌다[1,2].

전리 방사선 피폭에 의한 세포핵의 DNA 손상이 발생하면 항종양인자 p53이 핵내에 축적되고, 일차적으로 세포에 DNA 손상을 복구할 시간을 주기 위해서 일시적인 cell cycle arrest를 유도하게 된다(Devlin, 2006). 또한 p53은 apoptosis를 유도할 수 있다. DNA의 손상은 p53을 발현시키고 이는 p21, G_1-Cdk로 이어지는 경로를 통해 세포를 arrest상태로 만들어 S phase에 진입하기전 세포가 손상을 회복할 시간을 준다. 그러나 DNA 손상이 세포주기의 일시적 정지로 회복하기에는 너무 심한 경우, p53은 세포주기를 정지시키는데 필요한 양보다 훨씬 더 많이 증가되는데, 이로 인해 세포의 죽음이 일어난다. 이러한 세포의 죽음을 통하여 p53은 손상된 DNA로 인해 잘못된 기능을 가진 세포들을 제거함으로써 결과적으로 온전한 유전자를 보호하고 종양이 될 가능성을 가진 변이들을 제거함으로써 장기를 보호하게 된다. 이러한 p53의 조절기능이 사라질 경우, 손상된 DNA를 가진 세포가 늘어남으로 인하여 악성종양과 같은 조직이 만들어질 수 있다. 따라서 p53이 항종양인자로서 광범위하게 역할을 하고 있음을 알 수 있고, 유전자 수준에서 뿐만 아니라 단백질의 안정성과 기능적 활성을 유지하는 것이 그 역할을 수행하는데 필수적임을 확인할 수 있다.

지금까지 다양한 환경 스트레스에 대한 p53의 반응에 NF-κB, PI3-kinase, PTEN 등 다양한 인자들이 관여한다고 알려져 있는데, 최근에 PI3-K/Protein kinase B (AKT) 경로가 방사선 치료시 상향조절되어 방사선 저항성에 관여한다는 것이 알려졌다[3,4].

따라서 본 연구목표는 대장암세포에서 전리방사선 피폭 후 발생되는 유전자 손상의 복원에 주요인자인 p53단백질이 세포사 및 세포증식억제에 중요한 작용을 하고 있는 PI3-K/Akt 경로의 발현 및 작용에 미치는 영향을 관찰하여 방사선치료의 효율성을 높이는데 기여하고자 한다.

*Correspondence to: Hyoung-Cheol Kwon, Department of Radiation Oncology, Chonbuk National University Hospital, Jeonju, Korea
Tel: 82-63-250-1195, Fax: 82-63-250-1192
E-mail: hckwon@jbnu.ac.kr

재료 및 방법

재료

PTEN Antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구매했다. p85 Antibody는 Cell Signaling (Beverly, MD, USA)에서 구매했다. Fetal calf serum (FBS)은 Gibco BRL (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)에서 구매했다. HBSS (Hanks balanced salt solution), DMEM, b-actin antibody는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구매했다.

세포 수확 과 X-ray 방사선조사

Human colon cancer cell lines (HCT116)는 경희대 의과대학 서영록 교수님으로부터 확보하였다. 세포는 온도 37°C, 5% 이산화탄소, 95% 공기를 갖는 다습한 대기조건에서 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 항생제(Penicillin G 60 mg/L, Streptomycin 100 mg/L, Amphotericin B 50 ul/L)를 포함한 DMEM 배지로 성장시켰다. 방사선은 선형가속기 Primus (Siemens, Germany)를 이용하여 조사하였다. 6MV X-ray를 200MU/min의 dose rate로 2Gy, 1회조사하였으며 선량은 Helax 시스템을 이용하여 계산하였다.

Western blot 분석

세포를 PBS로 씻은 후 수확하여, 세포펠릿에 30 분동안 37°C에서 lysis buffer를 넣고 용해시킨다. 그후 cellular debris는 30 분 동안 10,000 × g 에서 원심분리하여 제거한다. 그리고 상(층)액은 Sodium dodesyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분석한다. slab gel을 nitrocellulose paper로 전기영동 한다. 그리고 1차 antibodies로 PTEN을 사용하고, 2차 antibody는 HRP가 붙은 p85 와 β-actin을 사용하였다. 활성 단백질은 enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, USA)로 검출하였다.

세포 생존력 결정

HCT116 세포의 생존력에 관한 X-ray효과는 MTT assay을 사용하여 결정했다. 3×10^4 cells/well 에 x-rays을 처리했다. 24 h 동안 배양 후, 세포를 PBS로 씻어 MTT (0.5 mg/ml PBS) 을 각 well에 첨가하고, 37°C 에서 30 min동안 배양했다. DMSO (100 ml/well)을 첨가하여 형성된 Formazan 결정을 풀어주고 570 nm microplate reader (Model 3550, BIO-RAD, Richmond, CA. USA)로 측정하였다.

데이타 분석

모든 실험 데이타는 mean ± standard error (SE)로 나타냈다. 통계분석은 Student's t test을 사용하였고, $p < 0.005$ 으로 유의성을 나타냈다.

결 과

대장암세포에서 X-ray의 조사에 의한 p53 활성화

본 연구에서 사용하고 있는 대장암세포 HCT116에서 X-ray의 조사에 의한 p53의 활성화를 확인하였다. HCT116 세포에 8Gy의 방사선을 조사하고 3시간 후에 검사한 결과, p53양성 세포에서 p53의 발현이 증가하였다. p53음성세포에서는 발현이 관찰되지 않았다. β-actin 항체로 둘 사이의 부하가 균등함을 확인하였다(Fig. 1).

대장암세포에서 p53이 세포내 PI3-K 및 PTEN의 기저농도에 미치는 영향

본 연구에서 사용하고 있는 대장암세포 HCT116에서 X-ray의 조사하기 전에 의한 세포내 PI3-K 및 PTEN의 기저농도에 미치는 p53의 영향을 확인하였다. 본 연구의 PI3-k의 발현은 p85의 변화를 통해 관찰 하였으며, 기저수준과의 차이에 대한 p53의 영향을 확인하기 위하여 p53 정상 및 결손형군을 비교하였으며, p53양성 세포에서 p85의 발현정도가 현저히 높았다. 이를 통하여 PI3-kinase의 발현이 증가되었음을 알 수 있다(Fig. 2A). PTEN은 p53결함세포에 비해 p53양성 세포에서 발현이 다소 높았다(Fig. 2B).

대장암세포에서 X-ray에 의하여 유도되는 PI3-K 및 PTEN의 신호전달에 활성화에 미치는 p53의 영향

마지막으로 대장암세포 HCT116에서 X-ray의 조사한 후 PI3-K 및 PTEN의 신호전달의 활성화에 미치는 p53의 영향을 확인하였다. p53 음성인 HCT116 세포에서는 p85의 변화가 없었으나, p53 양성인 경우는 노출 후 시간 경과에 따라 p85의 발현이 증가하였다(Fig. 3A). 또한 PI3-K (p85)의 활성의 표식자인 Akt의 인산화도 확인되었다(Fig. 3C). PTEN은 p53 양성

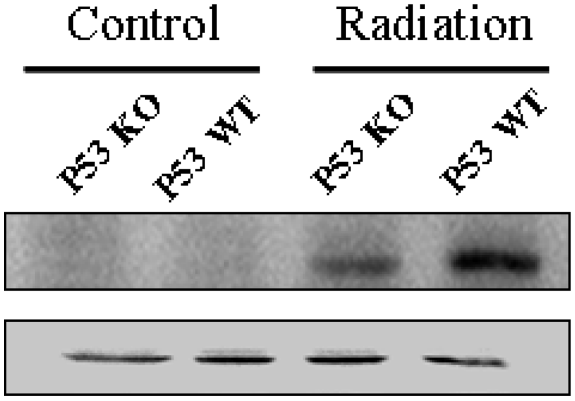

Fig. 1. X-irradiation activates expression of p53 in HCT116 cells. HCT116 cells in monolayers were exposed with 8 Gy of X-irradiaton and cultured 3h after X-irradiation. The cells were lysed, and the lysates were analyzed by immunoblotting used p53. The blot was reprobed with anti-β actin to confirm equal loading.

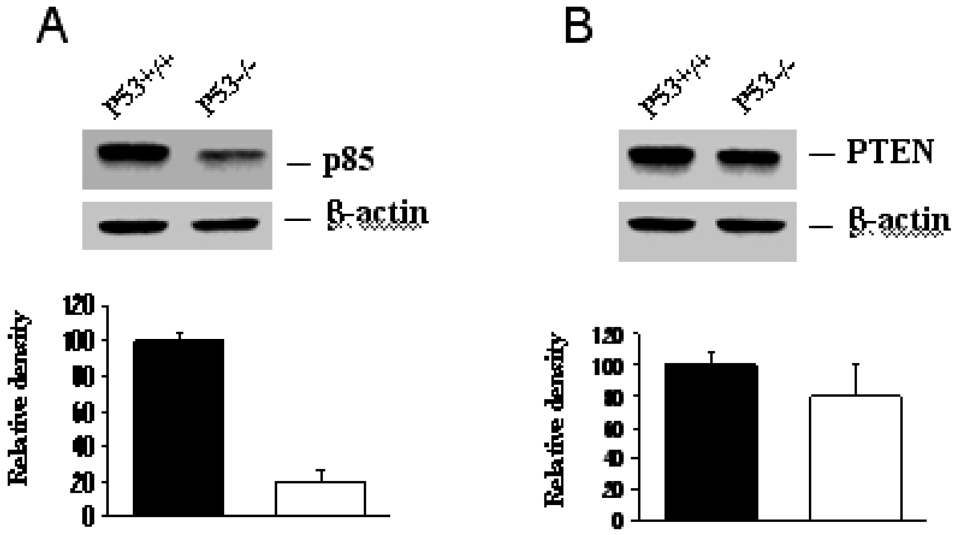

Fig. 2. Effects of p53 on the basal levels of PI3-Kinase/PTEN in HCT116 cells. HCT116 cells were lysed, and the lysates were analyzed by immunoblotting used p85/PI3-Kinase (A) and PTEN (B). The blot was reprobed with anti-β actin to confirm equal loading. The relative density of electrophoretic band was obtained with the LAS-1000 (Fujifilm, Japan) (lower panel). Data are means ± S.E of four separate experiments.

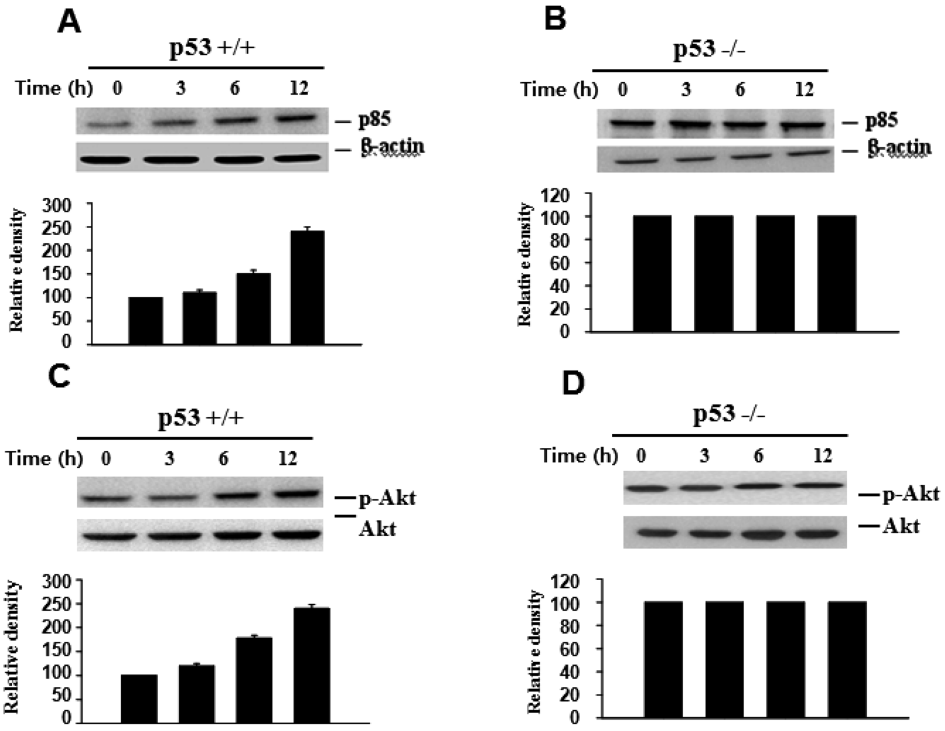

Fig. 3. Effect of p53 X-irradiation induced up-regulation of p85 and pAKt in HCT116 cells. HCT116 cells in monolayers were irradiated with 8Gy. At 0, 3, 6 and 12 hours after X-irradiation, the cells were lysed, and the lysates were analyzed by immunoblotting used p85/p-Akt. The blot was reprobed with anti-β actin to confirm equal loading. The relative density of electrophoretic band was obtained with the LAS-1000 (Fujifilm, Japan) (lower panel). Data are means ± S.E of four separate experiments.

세포에서 6시간까지는 발현이 증가하였으나, 12시간에서는 다소 감소하였고, p53 음성 세포에서는 시간에 따른 발현 변화가 없었다(Fig. 4).

고 찰

세포는 다양한 환경 스트레스에 노출되었을 때 외부의 해로운 자극으로부터 스스로를 보호하기 위한 방편으로 p53을

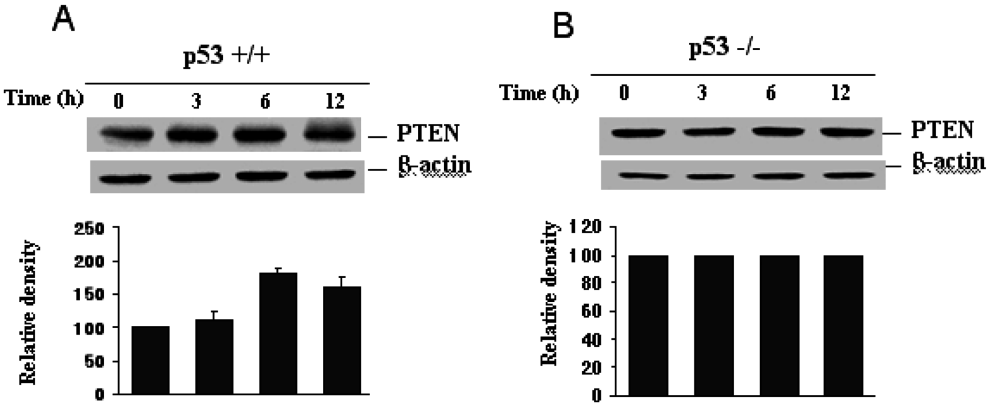

Fig. 4. Effect of p53 X-irradiation induced up-regulation of PTEN in HCT116 cells. HCT116 cells in monolayers were irradiated with 8Gy. At 0, 3, 6 and 12 hours after X-irradiation, the cells were lysed, and the lysates were analyzed by immunoblotting used p53. The blot was reprobed with anti-β actin to confirm equal loading. The relative density of electrophoretic band was obtained with the LAS-1000 (Fujifilm, Japan) (lower panel). Data are means ± S.E of four separate experiments.

비롯한 NF-κB 등 각종 전사인자들의 활성을 통해 스스로 죽거나, 성장이 억제되고, 노화에 돌입한다[5].

p53은 다양한 환경변이원에 의해 유발되는 종양 형성을 억제하는 항종양인자로 잘 알려져 있다. 예를 들어 세포가 UV나 IR에 노출되면 노출된 용량에 비례하여 p53의 핵내 농도가 증가하게 된다. 게다가, 광범위하게 사용되고 있는 화학요법제제들은 DNA를 손상시키고 p53 단백질 축적을 유도한다고 알려져 있다. 그러나 최근에는 hypoxia, heat shock, nucleotide depletion 역시 p53 축적을 유도할 수 있다고 보고되고 있다. p53은 DNA 손상에 의해 발현되는 transcription factor로서 세포주기의 주된 감시자이다.

DNA의 손상은 p53을 발현시키고 이는 p21, G1-Cdk로 이어지는 경로를 통해 세포를 arrest상태로 만들어 S phase에 들어가기 전 세포가 손상을 회복할 시간을 벌어준다[6,7]. 그러나 DNA 손상이 세포주기의 일시적 정지로 회복하기에는 너무 심한 경우, p53은 세포주기를 정지시키는데 필요한 양보다 훨씬 더 많이 증가되는데, 이로 인해 apoptosis가 일어난다[8,9].

p53은 세포의 죽음을 통하여 손상된 DNA로 인해 잘못된 기능을 가진 세포들을 제거함으로써 결과적으로 온전한 유전자를 보호하고, 또한 종양이 될 가능성을 가진 변이들을 제거함으로써 장기를 보호하게 된다. 이러한 p53의 조절기능이 상실될 경우, 손상된 DNA를 가진 세포가 늘어남으로 인하여 악성종양과 같은 조직이 만들어질 수 있다.

그러나 손상된 세포가 어떤 방식으로 p53에 의존적인 세포사와 세포주기 정지를 선택하는지는 명확하지 않다.

PTEN은 phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)에 의한 신호전달체계의 주요한 negative regulator로서 p53의 활성 및 안정성에 영향이 있다고 알려져있다[10]

PI3K는 세포막의 인지질 대사에서 세포의 증식 및 생존, 포도당 대사에 관련된 주요한 역할을 수행하며, 악성종양세포에서 p85의 과발현과 관련되어 있다[11].

PI3K이 활성화되면 serine-threonine protein kinase Akt (또는 protein kinase B, PKB)을 통하여 세포 성장 및 생존, 포도당 대사 및 단백질의 해석에 관련된 기능을 수행하여 방사선 치료의 저항성에 중요한 경로로 알려져 있다[12-19].

본 연구에서 p53 양성 세포군에서 p53의 발현이 증가됨을 확인하였으며, p85가 증가됨을 볼 때 PI3K의 증가를 확인할 수 있었다. 이러한 PI3K의 신호전달 활성화는 p-Akt의 발현이 증가됨이 확인됨으로써 p53의 존재에서 뚜렷하게 PI3K의 활성이 증명되었으며, 기저수준에서의 비교를 볼 때 p53의 존재 유무가 PI3K의 발현에 큰 영향을 미침을 알 수 있었다.

이와 같은 결과를 볼 때, 방사선조사의 경우 손상된 DNA로 인하여 발현되는 p53에 의존적으로 세포생존에 영향을 미치는 PI3K의 발현이 증가됨을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Grant S, Qiao L, Dent P. Roles of ERBB family receptor tyrosine kinases and downstream signaling pathways in the control of cell growth and survival. *Front Biosci*, **7**, 376-389 (2002).
2. Schmidt-Ullrich RK, Dent P, Grant S, Mikkelsen RB, Valerie K. Signal transduction and cellular radiation responses. *Radiat Res*, **153**, 245-257 (2000).
3. Gupta AK, Bakanauskas VJ, Cerniglia GJ, et al. The Ras radiation resistance pathway. *Cancer Res*, **61**, 4278-4282 (2001).
4. Grana TM, Rusyn EV, Zhou H, Sartor CI, Cox AD. Ras mediates radioresistance through both phosphatidylinositol-3-kinase-dependent and Raf-dependent but mitogen-activated protein kinase/extracellular signal regulated kinase kinase-independent signaling pathways. *Cancer Res*, **62**, 4142-4150 (2002).
5. Devlin, T.M.: *In Textbook of Biochemistry with clinical correlations*, 6th ed. (2006).
6. Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., and

Elledge, S. J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, **75**, 805-816 (1993).
7. Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, **366**, 701-704 (1993).
8. Levine, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **88**, 323-331 (1997).
9. Merritt, A. J. et al. The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice. *Cancer Res*, **54**, 614-617 (1994).
10. Baker SJ. PTEN Enters the Nuclear Age. *Cell*, **128**, 25-28 (2007).
11. Garcia et al. A PI3K activity-independent function of p85 regulatory subunit in control of mammalian cytokinesis. *The EMBO journal*, **25**, 4740-4751 (2006).
12. Edwards, E., Geng, L., Tan, J., Onishko, H., Donnelly, E., and Hallahan, D. E. E. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in the response of vascular endothelium to ionizing radiation. *Cancer Res.*, **62**, 4671-4677 (2002).
13. Gottschalk, A. R., Doan, A., Nakamura, J. L., Stokoe, D., and Haas-Kogan, D. A. Inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase causes increased sensitivity to radiation through a PKB-dependent mechanism. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **63**, 1221-1227 (2005).
14. Gupta, A. K., Cerniglia, G. J., Mick, R., Ahmed, M. S., Bakanauskas, V. J., Muschel, R. J., and McKenna, W. G. Radiation sensitization of human cancer cells in vivo by inhibiting the activity of PI3K using LY294002. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **56**, 846-853 (2003).
15. Gupta, A. K., McKenna, W. G., Weber, C. N., Feldman, M. D., Goldsmith, J. D., Mick, R., Machtay, M., Rosenthal, D. I., Bakanauskas, V. J., Cerniglia, G. J., Bernhard, E. J., Weber, R. S., and Muschel, R. J. Local recurrence in head and neck cancer: Relationship to radiation resistance and signal transduction. *Clin. Cancer Res.*, **8**, 885-892 (2002).
16. Kim, I. A., Bae, S. S., Fernandes, A., Wu, J., Muschel, R. J., McKenna, W. G., Birnbaum, M. J., and Bernhard, E. J. Selective inhibition of Ras, Phosphoinositide 3 kinase, and Akt isoforms increases the radiosensitivity of human carcinoma cell lines. *Cancer Res*, **65**, 7902-7910 (2005).
17. Lee, C. M., Fuhrman, C. B., Planelles, V., Peltier, M. R., Gaffney, D. K., Soisson, A. P., Dodson, M. K., Tolley, H. D., Green, C. L., and Zempolich, K. A. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition by LY204002 radiosensitizes human cervical cancer cell lines. *Clin. Cancer Res*, **12**, 250-256 (2006).
18. Li, B., Yuan, M., Kim, I. A., Chang, C. M., Bernhard, E. J., and Shu, H. K. Mutant epidermal growth factor receptor displays increased signaling through the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway and promotes radioresistance in cells of astrocytic origin. *Oncogene*, **23**, 4594-4602 (2004).
19. Nakamura, J. L., Karlsson, A., Arvold, N. D., Gottschalk, A. R., Pieper, R. O., Stokoe, D., and Haas-Kogan, D. A. PKB/Akt mediates radiosensitization by the signaling inhibitor LY294002 in human malignant gliomas. *J. Neuro-oncol*, **71**, 215-222 (2005).